III. METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Juni sampai Juli 2012 bertempat di Laboratorium Budidaya Perairan Fakultas Pertanian Universitas Lampung dan Laboratorium Stasiun Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Kelas I Lampung.

B. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah: timbangan digital, gelas ukur, blender, *vortex* (BDECO, Germany™), mikropipette (Nesco®), autoklaf, *vacum evaporator* (Heidolph), lemari es, jangka sorong 0,05 mm, lampu bunsen, inkubator, cawan petri 150 x 15 mm (Normax®), tabung reaksi 5 ml (Iwaki glass™), erlenmeyer 500 ml dan 250 ml (Pyrex®), *spreader*, pipet tetes, jarum *ose*, *magnetic stirer*, *hot plate* (Stuart CB162™), aluminium foil, plastik tahan panas, kertas kopi, kapas steril, kertas label, masker, karet gelang, sarung tangan, pisau, korek api, kertas saring, kapas, kertas cakram, saringan, tisu, *laminary flow*, corong, mikroskop,wadah penetasan *Artemia salina*, lampu, spektrofotometer (Genesys-20, Thermospectronic), pipet volumetri 10 ml (Pyrex®), kamera digital, dan alat tulis.

Sedangkan bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah inokulum murni bakteri *V. alginolyticus*, *V.vulnivicus*, *V. parahaemolyticus*, dan *V. ordalii*, *Artemia salina*, buah *Rhizopora* sp., media TSA 2,5 % NaCL (OXOID^{TM}, UK), TSB 2,5 % NaCL (OXOID^{TM}, UK), MHB (*Muller Hilton Broth*) 2,5 % NaCL, Alkohol 70%, metanol, heksana, etil asetat, aquades dan air laut.

C. Metode Penelitian

Pelaksanaan penelitian terbagi menjadi 2 tahap (Gambar 2), yaitu:

1. Tahap Persiapan

a. Sterilisasi Alat dan Bahan

Sterilisasi merupakan usaha yang dilakukan untuk membebaskan alat dan bahan dari mikroorganisme kontaminan, dapat dilakukan dengan cara mencuci alat dan bahan yang akan digunakan sampai bersih tunggu sampai kering dan bungkus menggunakan kertas kopi, hal ini bertujuan untuk mencegah alat-alat tersebut terkena air, selanjutnya masukan alat-alat tersebut ke dalam autoklaf dengan suhu 121^0C, tekanan 1 atm selama 15-20 menit.

b. Pembutan Ekstrak

Pembuatan ekstrak dilakukan dengan menggunakan metode maserasi. Buah yang matang dicuci sampai bersih kemudian dikeringkan pada suhu ruangan sampai kering, selanjutnya buah dihaluskan dengan menggunakan blender dan diayak dengan saringan sampai didapatkan bubuk halus.

Proses ekstraksi dilakukan dengan melarutkan 100 gram bubuk buah *Rhizophora* sp. dengan 3 jenis larutan yaitu heksana, etil asetat dan metanol masing-masing sebanyak 500 ml. Kemudian hasil maserasi disaring dengan menggunakan kertas saring dan dievaporasi menggunakan *vacum evaporator* dan didapatkan ekstrak buah *Rhizophora* sp.

c. Penyiapan Bakteri Uji

Bakteri uji yang akan digunakan pada penelitian ini adalah yang berasal dari Laboratorium Strasiun Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Kelas I Lampung.

2. Tahap Pelaksanaan

a. Uji Sensitifitas

Uji sensitifitas bertujuan untuk mengetahui potensi antibakteri yang terkandung di dalam ekstrak buah *Rhizopora* sp. dengan konsentrasi 100 % yang dilarutkan menggunakan 3 pelarut berbeda terhadap bakteri *V. alginolyticus*, *V.vulnivicus*, *V. parahaemolyticus,* dan *V. ordalii.* Uji sensitifitas dilakukan dengan menggunakan metode difusi (*Diffusion Test*) menggunakan kertas cakram. Hasil uji aktivitas antibakteri dengan metode kertas cakram ditunjukkan dengan adanya zona bening di sekitar kertas cakram. Sebanyak 20 *µl* isolat cair *Vibrio* masing – masing dengan kepadatan 10^7 cfu/ml diteteskan pada media TSA lalu diratakan dengan *spreader*. Kertas cakram dengan diameter 6 mm yang telah direndam di dalam ekstrak buah *Rhizophora* sp yang dilarutkan dengan 3 jenis pelarut berbeda (heksana, etil asetat dan methanol) selama 15 menit, kemudian diletakkan pada permukaan media TSA. Lalu diinkubasi selama 18-24 jam

(Rinawati, 2011). Pengamatan Uji sensitifitas dilakukan dengan melihat zona hambat ekstrak buah *Rhizophora* sp. yang terbentuk terhadap bakteri *V. alginolyticus*, *V.vulnivicus*, *V. parahaemolyticus*, dan *V. ordalii.*

b. Uji Zona Hambat

Uji zona hambat dilakukan dengan menggunakan metode difusi (*Diffusion Test*) menggunakan kertas cakram. Uji zona hambat dilakukan berdasarkan hasil uji sensitifitas ekstrak buah *Rhizopora* sp. yang menunjukan potensi antibakteri Sebanyak 20 μl isolat cair *Vibrio* masing – masing dengan kepadatan 10^7 cfu/ml. diteteskan pada media TSA lalu diratakan dengan *spreader*. Kertas cakram dengan diameter 6 mm yang telah direndam di dalam ekstrak buah *Rhizophora* sp. pada konsentrasi 100, 200, 300, 400, 500 dan 600 mg/l selama 15 menit, kemudian diletakkan pada permukaan media TSA. Kontrol positif dilakukan dengan memberikan kertas cakram berisi antibiotik *oxytetracycline,* sedangkan kontrol negatif berupa kertas cakram netral (hanya diberi akuades). Lalu diinkubasi selama 18-24 jam. Setelah masa inkubasi, kemudian diamati dan diukur diameter zona hambat yang terbentuk di sekitar kertas cakram tersebut (Anonim, 1993 *dalam* Novia 2010).

Pengamatan uji zona hambat dilakukan dengan mengukur diameter zona hambat ekstrak buah *Rhizophora* sp. terhadap bakteri *Vibrio* spp.

c. Uji MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*)

Uji MIC dilakukan berdasarkan hasil uji zona hambat. Uji MIC bertujuan untuk mencari konsentrasi terendah bahan anti bakteri yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Metode Penentuan MIC langkah awal yang dilakukan yaitu disiapkan tabung reaksi steril dan dimasukkan 4,5 ml media MHB (*muller hilton*

broth) ke dalam masing-masing tabung reaksi. Ekstrak buah *Rhizophora* sp. dengan konsentrasi 100, 200, 300, 400, 500, 600 mg/l dan kontrol, control positif berupa antibiotik *oxytetracyline*, sedangkan kontrol negatif hanya diberi bakteri, dimasukkan sebanyak 0,5 ml ke dalam masing-masing tabung reaksi. Kemudian suspensi bakteri *Vibrio* spp. dengan kepadatan 10^7 cfu/ml sebanyak 0,1 ml ditambahkan kedalam masing-masing tabung reaksi dan divortek hingga homogen. Media MHB diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam (Boyd, 1995 *dalam* Rinawati, 2011).

Pengamatan uji MIC dilakukan dengan melihat kekeruhan media MHB yang telah diberi ekstak buah *Rhizophora* sp..

d. MBC (*Minimum Bactericidal Concentration)*

MBC didapat setelah menginokulasikan larutan dari tabung MIC terjernih pada media. Diambil 0,1 ml suspensi bakteri dari tabung pada perlakuan yang menunjukkan nilai MIC sampai konsentrasi sebesar 100 %, kemudian ditumbuhkan dalam medium TSA 2,5 % dengan cara *pour plate*. Diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Setelah diinkubasi, dihitung jumlah koloni yang tumbuh pada medium TSA 2,5 %. Nilai MBC ditentukan dari konsentrasi terendah ekstrak yang menunjukkan tidak adanya pertumbuhan koloni pada cawan petri (Boyd, 1995 *dalam* Rinawati, 2011).

Pengamatan uji MBC dilakukan dengan melihat konsentrasi terendah ekstrak yang menunjukkan tidak adanya pertumbuhan koloni pada cawan petri.

e. Uji Toksisitas (*Brine Shrimp Lethality Test*)

Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) merupakan salah satu metode uji toksisitas yang banyak digunakan dalam penelusuran senyawa bioaktif yang bersifat toksik dari bahan alam. Uji Toksisitas dengan Metode BSLT digunakan untuk mempelajari toksisitas sampel secara umum dengan menggunakan larva artemia (*Artemia salina* Leach) (Juniarti, 2009).

Penetasan Larva *A. salina*. Wadah berbentuk kerucut disiapkan untuk penetasan telur. Lampu untuk menghangatkan suhu dalam penetasan. Botol diisi air laut dan diberi aerasi, kemudian dimasukkan telur Artemia sebanyak 1 g. Lampu dinyalakan selama 24 jam untuk menetaskan telur. Setelah menetas larva Artemia diambil dengan pipet.

Persiapan Larutan Sampel yang akan diuji. Ekstrak yang akan diuji dibuat dengan perbandingn 0,5 : 1 : 1,5 : 2 : 2,5 : 3 kali konsentrasi ekstrak *Rhizopora* sp. hasil terbaik dari uji *In vitro*.

Prosedur Uji Toksisitas dengan Metode BSLT. Larutan sampel yang akan diuji masing-masing perbandingan konsentrasi 0,5 : 1 : 1,5 : 2 : 2,5 : 3. Setiap konsentrasi dilakukan 3 kali pengulangan. Untuk kontrol dilakukan tanpa penambahan sampel. Air laut ditambahkan ke dalam masing – masing botol sampai volume menjadi 2 ml kemudian larutan diaduk sampai homogen.. Larva *A. salina* lalu dimasukkan masing – masing sebanyak 20 ekor dengan menggunakan pipet ke dalam wadah uji. Larutan dibiarkan selama 24 jam, kemudian dihitung jumlah larva yang hidup dan mati dan hidup dari tiap perlakuan.

Selanjutnya dihitung mortalitas *A. salina*. Grafik dibuat dengan log konsentrasi sebagai sumbu x terhadap mortalitas sebagai sumbu y. Nilai LC_{50} merupakan konsentrasi dimana zat menyebabkan kematian 50% yang diperoleh dengan memakai persamaan regresi linier y = a + bx. Suatu zat dikatakan aktif atau toksik bila nilai LC_{50} < 1000 ppm untuk ektrak (Juniarti, 2009).

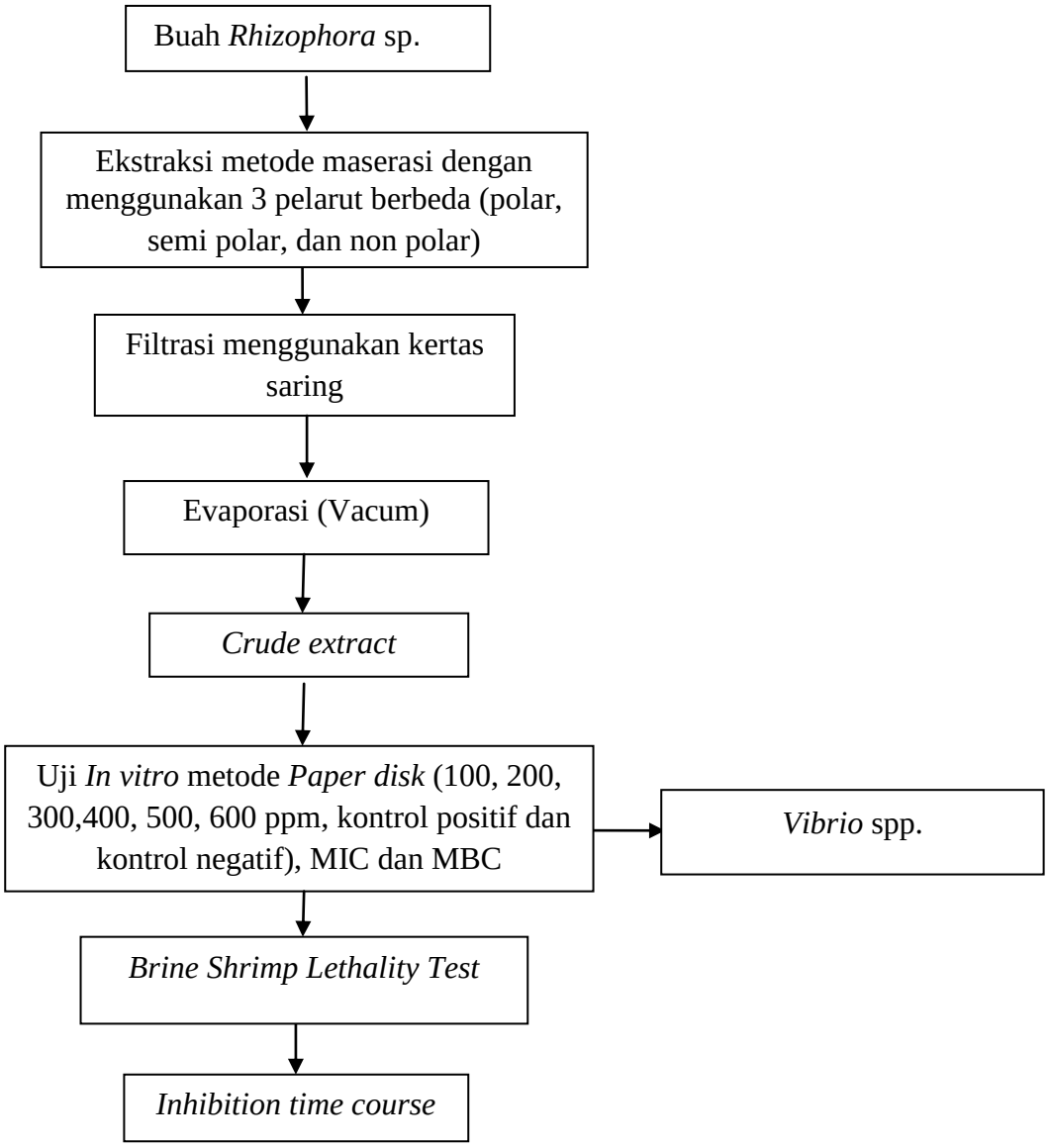
Pengamatan uji toksisitas dilakukan dengan melihat mortalitas *artemia salina* dengan cara melihat jumlah artemia yang hidup dan jumlah artemia yang mati (Juniarti, 2009).

$$Mortalitas = \frac{akumulasi\ mati}{Jumlah\ akumulasi\ total} x100\%$$

f. Uji *Inhibition Time Course*

Uji *inhibition time course* bertujuan untuk melihat waktu ekstrak *Rhizopora* sp. dapat menghambat bakteri. Langkah awal dalam uji *inhibition time course* pertama membuat media TSB dengan air laut steril, dimasukan kedalam tabung erlemayer masing – masing sebanyak 50 ml, kemudian ekstrak dimasukan kedalam masing – masing tabung erlenmayer sehingga dosis ekstrak menjadi 1 MIC, 2 MIC, dan 3 MIC, dengan control positif menggunakan *oxytetracyline,* dan control negatif tanpa pemberian antibiotik. Kemudian, sebanyak 50 µl dengan kepadatan 10^8 sel/ml inokulasi bakteri yang telah disiapkan 1 hari sebelumnya dimasukan kedalam erlenmayer. Pengamatan dilakukan setiap 3 jam selama 24 jam, pengamatan dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer (Isnansetyo dan Kamei,.1999)..

Pengamatan Uji *Inhibition Time Course* dilakukan dengan menghitung kepadatan bakteri dengan menggunakan alat spektrofotometer.



Gambar 2. Tahapan penelitian